

THESIS

MUNICH

1967

**Untersuchungen zur Einwirkung
von Butylbiguanid auf die
Seruminsulinspiegel
von normalgewichtigen und
fettsüchtigen Personen**

Irmhild Angstenberger

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153723_0038

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

UNTERSUCHUNGEN ZUR EINWIRKUNG VON BUTYLBIGUANID AUF DIE
SERUMINSULINSPIEGEL VON NORMALGEWICHTIGEN UND FETT-
SÜCHTIGEN PERSONEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig - Maximilian - Universität zu München

vorgelegt von

Irmhild Angstenberger
Breslau

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Priv. Dozent Dr. H. Mehnert

Coreferent: Prof. Dr. W. Seitz

Dekan: **Prof. Dr. M. Kiese**

Tag der mündlichen Prüfung: 10.1. 1967

INHALTSVERZEICHNIS

- I. Einleitung
- II. A. Patientengut
B. Wirkungsweise der Biguanide
C. Methodik
 - Insulinbestimmung
 - Glucosebestimmung
- III. Ergebnisse
- IV. Diskussion
- V. Zusammenfassung
- VI. Literaturverzeichnis

I. Einleitung:

Bei der oralen Diabetestherapie stehen zwei Substanzgruppen im Mittelpunkt des Interesses: die Sulfonamidderivate und die Biguanide. Diese Stoffe unterscheiden sich grundsätzlich hinsichtlich Wirkungsweise, Indikationsbereich und Nebenwirkungen (1). Nach allgemeiner Ansicht bewirken die β -cytotropen Sulfonamidabkömmlinge eine Verstärkung der Insulinsekretion (2), während die Biguanide offensichtlich einen peripheren Angriffspunkt im Sinne einer verstärkten Glucoseutilisation in Muskulatur (3,4) und Fettgewebe (5,6) aufweisen. Die Tatsache, daß die zumeist fettsüchtigen Altersdiabetiker häufig mit Sulfonamidderivaten behandelt werden und daß bei diesen Patienten damit die Sekretion des die Lipogenese fördernden Hormons Insulin angeregt wird, verursachte Bedenken hinsichtlich der Zweckmäßigkeit einer solchen Therapie. Insbesondere wurde die Frage aufgeworfen, ob nicht die Applikation von Biguaniden, also jenen Substanzen, die nicht die Insulinsekretion anregen, für die Behandlung von Altersdiabetikern sinnvoller ist. Untersuchungen von Grodsky und Mitarbeitern ließen tatsächlich erkennen, daß die dreitägige Verabreichung von Biguaniden sogar zu einer Hemmung der Insulinsekretion nach Glucosegabe führt, ohne daß die Glucosetoleranz nachteilig beeinflusst worden wäre (7).

Aufgabe dieser Arbeit sollte sein, durch Bestimmung des "freien" und "gebundenen" Insulins und der Glucose im Serum zu Grodsky's Ergebnissen

Stellung zu nehmen. Im Gegensatz zu den amerikanischen Autoren sollte dabei die Insulinsekretion im akuten Versuch ohne zusätzliche Glucosebelastung überprüft werden, um auf diese Weise den Einfluß der Biguanide auf die Freisetzung des Hormons erkennbar zu machen. Von einer Verabreichung von Glucose wurde dabei Abstand genommen, da gerade die Frage der Beeinflussung der Insulinsekretion auch ohne die starke stimulierende Wirkung des Traubenzuckers von Interesse war. Wichtig schien jedoch die Unterscheidung von Fettsüchtigen und Normalgewichtigen zu sein, um auf diese Weise eine mögliche günstige Beeinflussung der höheren Seruminsulinspiegel Fettsüchtiger erkennen zu können. Diese Untersuchungen waren auch deswegen von Interesse, da nach Ansicht von Sterne (28) die Biguanide möglicherweise eine Umwandlung des gebundenen in freies Insulin bewirken könnten.

II. Patientengut, Wirkungsweise der Biguanide und Methodik

A. Patientengut und Durchführung der Blutentnahme

Das Patientengut stammte aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. W. Seitz). Alle Patienten waren Nichtdiabetiker und waren wegen unterschiedlicher Erkrankungen stationär aufgenommen worden. Nierenerkrankungen, Herzinfarkte, Polyarthritiden und arterielle Durchblutungsstörungen stellten besonders oft die Ursache dar. Von den 30 Patienten, die zur Verfügung standen, konnten nur 23 ausgewertet werden, da 4 die Blutentnahme nach Biguanidgabe verweigerten oder vorher auf eigenen Wunsch die Klinik verließen und bei 3 Patienten die Insulinwerte durch eine unbrauchbare Standardkurve nicht gemessen werden konnten.

Mit Hilfe von Größe und Gewicht wurde nach Broca das Übergewicht der Patienten bestimmt und ein Übergewicht von mehr als 10% des Sollgewichts als Grenze zwischen Normalgewichtigen und Fettsüchtigen festgesetzt.

Die Blutentnahmen bei den stets nüchternen Patienten wurden in der Regel an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils in Abständen von einer Stunde von einer Vene des Unterarms aus durchgeführt. Der erste Versuchstag diente als "Vorversuch". Am zweiten Versuchstag, "Hauptversuch", wurden den Patienten nach der ersten Blutentnahme 100 mg Butylbiguanid (Silubin, Fa. Grünenthal) per os zugeführt. Die drei Blutentnahmen eines jeden Tages sind mit 0', 60' und 120' bezeichnet. Diese Blutproben ließen wir ca. 30 Min. stehen und gewannen dann durch fünfminütiges Zentrifugieren

bei 3000 U/Min. das Serum. Dieses wurde bis zum Aufarbeiten bei -15° C aufbewahrt.

B. Wirkungsweise der Biguanide

Chemische Formel des Butylbiguanid:



Die früher vertretene Hypothese, Biguanide würden durch Hemmung der Endoxydation oder der oxydativen Phosphorylierung zu einer anaeroben Glykolyse führen, ist heute nicht mehr haltbar, wie u.a. Untersuchungen von H. Mehnert gezeigt haben (8). Eine herabgesetzte Glucoseoxydation wie auch Leberparenchymschäden wurden bei Biguanidkonzentrationen im Serum gefunden, die unter therapeutischen Dosen niemals erreicht werden. Bei diesen ist vielmehr die Glucoseoxydation erhöht (5,8,9). Nach oraler Gabe von 100 mg Butylbiguanid fanden Beckmann und Hübner beim Menschen Serumspiegel von 0.3 - 0.6 $\mu\text{g/ml}$, während in vitro bei Hemmung der Glucoseoxydation 20 - 1000 $\mu\text{g/ml}$ vorlagen (10).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Biguanide im Gegensatz zum Insulin nur am Muskelgewebe, nicht aber am Fettgewebe wirksam sind. Die Glucoseaufnahme des epididymalen Rattenfettgewebes wird durch Biguanide nicht gesteigert, wenn die Biguanidkonzentration therapeutischen Blutspiegeln entspricht (11). In vitro findet sich unter Biguaniden eine verminderte Lipogenese und in vivo eine Abnahme des Triglyceridserumspiegels (12), was gut zusammenpaßt. Schless fand sogar in vivo unter Biguaniden eine Fettmobilisierung (4). Im Gegensatz zu ihrer Wirkung am Muskel potenzieren Biguanide am Fettgewebe die Wirkung kristallinen Insulins nicht (6).

Interessant ist auch eine Beobachtung von Köhler und Lippmann: Butylbiguanid konnte eine Leberverfettung bei Fischen verhindern, die durch Zwangsverfütterung von Glucose hervorgerufen wird (13). Der gleiche Effekt zeigt sich mit Insulin, jedoch nicht mit Sulfonylharnstoffpräparaten. Wilks und Mitarbeiter fanden unter Biguanidtherapie bei Diabetikern einen Ausgleich der sonst negativen Stickstoffbilanz (14) und Schwartz und Mitarbeiter eine Senkung des Serumcholesterinspiegels (12).

Untersuchungen, die die Wirkung der Biguanide auf den Kohlenhydratstoffwechsel klären sollten, ergaben eine erhöhte Zellpermeabilität im Muskelgewebe für Glucose (15,16). Eine vermehrte Glucoseaufnahme durch das Muskelgewebe bei mit Biguanid behandelten Diabetikern fanden Whichelow und Mitarbeiter (17) und auch Schless (4), während bei Stoffwechselgesunden dieser Effekt nicht zu beobachten war. Das läßt sich erklären durch die Tatsache, daß bei Diabetikern die Schwelle für die Glucoseverwertung in der Muskulatur erhöht ist (3) und diese Schwelle sich wie durch Insulin auch durch Biguanide erniedrigen läßt (17). Wiederum bei Diabetikern, jedoch nicht bei Stoffwechselgesunden, sah Butterfield unter Biguaniden einen vermehrten Eintritt von Insulin in das Muskelgewebe (18) mit parallel dazu gesteigertem Glucoseverbrauch. Hildmann und Lippmann fanden in vivo bei normalen und alloxandiabetischen Ratten ähnlich wie nach Insulin eine Inhibierung der Glucose-6-phosphatase der Leber (19). Durch die Hemmung dieses Enzyms erklären sie eine Verminderung der Blutglucosespiegel.

Trotz all dieser zahlreichen Untersuchungen kann man über den genauen Wirkungsmechanismus der Biguanide nur Theorien aufstellen. Sicher kann man

nur sagen, daß die früheren Hypothesen einer Hemmung der aeroben Glykolyse und einer verstärkten Insulinsekretion durch β -cytotrope Wirkung auf das Pankreas nicht zutreffend sind.

C. Methodik

Prinzip der Insulinbestimmung

Zur Bestimmung der Seruminsulinkonzentrationen wurde die Methode nach Froesch (20) verwendet. Diesem Nachweis liegt folgendes Prinzip zugrunde:

Im Nebenhodenfettgewebe der juvenilen Ratte, das sich durch einen besonders lebhaften Stoffwechsel auszeichnet (21,22), wird

Glucose oxydiert zu CO_2 und H_2O .

Glykogen aus Glucose aufgebaut

Fettsäuren aus Glucose, Acetat, Propionat gebildet

Insulin verstärkt die Glucoseaufnahme

Fettsynthese

Sauerstoffverbrauch

Der Effekt von Insulin in vitro auf den Stoffwechsel des isolierten Fettgewebes kann durch Bestimmung der Oxydation von Glucose zu CO_2 quantitativ gemessen werden, da besonders bei diesem Gewebe die Rate der Glucoseoxydation von der anwesenden Insulinmenge abhängig ist. Gemessen wird der Nettogasaustausch des Rattenfettgewebes, das mit dem zu untersuchenden Serum und Glucose-Pufferlösung inkubiert wird. Es konnte mehrfach gezeigt werden, daß ein logarithmischer Zusammenhang zwischen vorhandener Insulinkonzentration und entwickelter Gasmenge besteht. Definitionsgemäß spricht man im Hinblick auf die gewonnenen CO_2 -Mengen nicht von Insulinaktivität, sondern

von insulinähnlicher Aktivität (insulin like activity = ILA), da auch andere Substanzen die Glucoseoxydation am Fettgewebe beeinflussen können. Es wird nur die effektive Insulinwirkung gemessen, nicht der absolute Insulingehalt.

Mit diesem Verfahren wird am Fettgewebe die gesamte, im untersuchten Patientenserum enthaltene ILA wirksam: das sog. freie Insulin (= die durch spezifische Antikörper unterdrückbare ILA) und das sog. gebundene Insulin (= die durch spezifische Antikörper nicht unterdrückbare ILA). Um den Anteil der gesamten ILA an gebundenem und freiem Insulin zu bestimmen, wird die ILA eines jeden Serums auch nach Zusatz eines spezifischen Antiinsulinserums gemessen. Mit diesem Verfahren wird nur die nicht unterdrückbare ILA, das gebundene Insulin bestimmt, da das durch die Antikörper unterdrückte "freie" Insulin keine Wirkung mehr auf den Fettstoffwechsel entfalten kann. Die Differenz der mit beiden Verfahren bestimmten Werte ergibt den Anteil an "freiem" Insulin.

Die Insulinaktivität der Proben wird mit Hilfe eines graphischen Verfahrens bestimmt. Für jede, mit dem gleichen Fettgewebe durchgeführte Versuchsreihe bedient man sich dabei eines Koordinatensystems, auf dessen logarithmisch unterteilter Abszisse die Insulinkonzentrationen aufgetragen sind und auf dessen linear unterteilter Ordinate man die umgerechneten Meßergebnisse einträgt (ml Gas/g Fett und Stunde). Mit Hilfe einer für jeden Versuch festgelegten Geraden durch die Eichwerte bekannter Insulinstandardkonzentrationen werden die unbekannten Insulinwerte der Serumproben an der Abszisse abgelesen, nachdem man die Meßergebnisse umgerechnet und an der Ordinate eingetragen hat.

Berechnung

Grundlage der manometrischen Meßmethode ist die genaue Ermittlung des Systemvolumens, das die Ausgangsgröße für die zur Auswertung der manometrischen Ablesung unerläßliche Bestimmung der Gefäßkonstante ist. Nach Masangabe des Volumens der Kapillaren des angeschlossenen Manometers bis zur festgelegten Marke und des leeren Reaktionsgefäßes ergibt sich die Gefäßkonstante K für jedes Reaktionssystem aus folgender Formel:

$$K = \frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha}{P_0}$$

V_G = Volumen des Gasraumes im Versuchsgefäß einschließlich Manometerkapillare.

V Warburgtrog + V Manometer
- 0,10 (Fettkorrektur) - V_F

T = absolute Versuchstemperatur
(310,5° Kelvin)

V_F = Volumen des eingefüllten Inkubationsmediums (in unserem Fall stets 2 ml)

α = Bunsen'scher Absorptionskoeffizient des entstehenden Gases (für CO_2 und 37,5° C 0,567)

P_0 = 760 mm Hg umgerechnet auf Manometerflüssigkeit (bei Brodie-lösung = 10)

Die Menge des pro g Fettgewebe und Stunde entwickelten Gases ergibt sich aus

$$x = \frac{h \cdot K}{\text{Gewicht} \cdot \text{Stunden}}$$

h = Höhenunterschied der beiden Manometerschenkel bei Versuchsende.

Versuchsbeschreibung:

Pro Versuch wurden 18 Bestimmungen durchgeführt. 6 waren den Insulinstandardkonzentrationen von 2 x 100, 2 x 500 und 2 x 1000 μ E Insulin/ml vorbehalten. In den 12 restlichen Proben wurde die ILA der 6 Seren eines Patienten (0', 60', 120' des ersten und zweiten Versuchstages) einmal mit und einmal ohne Antiserum bestimmt. Es kam ein aus mit Rinderinsulin immunisierten Meerschweinchen gewonnenes Antiserum zur Anwendung.⁺ Der Titer des Antiinsulinserums wurde mit Lösungen von kristallinem Insulin bekannter Konzentration bestimmt. Die pro Reaktionsansatz nötigen Mengen bewegten sich zwischen 0,08 und 0,24 ml Antiinsulinserum je nach Tier.

⁺ Herrn Dr. Beckmann, Chemie Grünenthal GmbH, Stolberg (Rheinland), bin ich für die Herstellung und Überlassung des Antiserums zu besonderem Dank verpflichtet.

In jedes Reaktionsgefäß wurden 0,4 ml Serum, das kurz vor Versuchsbeginn bei Raumtemperatur aufgetaut war, und 1,6 ml Glucose - Pufferlösung (oder entsprechend der Antiserummenge weniger) pipettiert. Somit wurde eine Serumverdünnung erzielt, die von verschiedenen Autoren als optimale Verdünnung angesehen wird. Bei den Standardansätzen wurde statt des Serums eine Lösung kristallinen Insulins pipettiert, so daß die Insulinmenge/ml 2×100 , 2×500 und $2 \times 1000 \mu$ E Insulin betrug. Die so beschickten Gefäße wurden verschlossen und anschließend gewogen. Das Gewicht wurde bis auf 0,0001 g genau bestimmt. Danach erfolgte die Fettgewebspräparation.

120 - 150 g schwere männliche Sprague-Dawley Ratten wurden ad libitum mit Altromin-Spezialkost gefüttert und 12 Stunden vor Versuchsbeginn auf Hunger gesetzt. Die Tiere wurden durch einen Schlag auf den Kopf getötet, decapitiert und entblutet. Das Abdomen wurde breit eröffnet und die beiden, den Nebenhoden aufsitzenden Fettgewebszipfel distal von den Gefäßen so abgeschnitten, daß der Nebenhoden auf keinen Fall verletzt wurde. Im Hinblick auf die biologische Aktivität kann man die beiden epididymalen Fettgewebsanhänge einer Ratte gleichsetzen. Pro Versuch wurden 9 Ratten benötigt. Jeder Fettgewebszipfel wurde von distal nach proximal in 9 gleich große Teile geteilt, so daß man von jedem Tier 18 Fettgewebsstückchen erhielt. Diese Gewebsstückchen wurden so auf die 18 Reaktionsgefäße verteilt, daß jedes Gefäß von jeder Ratte einen Fettgewebsanteil erhielt. Die in jedem Trog enthaltenen 9 Neuntel setzten sich aus den 9 topo-

graphisch verschiedenen Abschnitten der Fettgewebszipfel zusammen. Dadurch wurde ein gutes biologisches Mittel erreicht über die verschiedenen Ratten und über die distalen, medialen und proximalen Abschnitte des Fettgewebes, die ja unterschiedliche Aktivität besitzen können. Das Fettgewebe wurde so sorgfältig wie möglich behandelt, um Quetschungen zu vermeiden. Es wurde aber dennoch auf möglichst gleichmäßig große Fettabschnitte geachtet, was Froesch ja als besonders wichtig für die Gewinnung möglichst genauer Ergebnisse beschrieben hatte.

Die Inkubationsgefäße wurden auch nach der Zugabe des Fettgewebes gewogen, und durch die Differenz zur ersten Gewichtsbestimmung wurde die Menge des zugesetzten Fettes bestimmt. Es wurde versucht, ein durchschnittliches Fettgewicht von 150 mg pro Inkubationsgefäß einzuhalten.

Die Tröge wurden an Warburg'sche Kapillaranometer angeschlossen, und es wurde ca. 7 Min. lang gewartet, bis mit dem Wasserbad des Warburgapparates ($37,5^{\circ}\text{C}$) ein Temperatúrausgleich erzielt wurde. Danach wurden unter Schütteln alle Gefäße gleichzeitig etwa 5 Min. lang mit Carbogen (95% O_2 und 5% CO_2) begast, die Manometerschenkel auf die Fixpunkte eingestellt und die Hähne geschlossen. Die Inkubation dauerte 150 Minuten bei einer Temperatur von $37,5^{\circ}\text{C}$ und einer Schüttelfrequenz von 96/Min. Die Druckdifferenz zwischen den beiden Manometerschenkeln wurde anfangs alle 15, später alle 30 Min. abgelesen. Der nach 150 Min. erreichte Höhenunterschied bildete die Berechnungsgrundlage.

Herstellung der Krebs-Ringer Pufferlösung

Krebs-Ringer Lösung:

NaCl	8.26 g	= 141	m Mol Endkonzentration
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.3359 g	2.284	"
KCl	0.422 g	5.660	"
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.350 g	1.420	"
KH ₂ PO ₄	0.1935 g	1.420	"

ad 1000 ml aqua bidestillata

Natriumbikarbonatlösung

NaHCO₃ 2.875 g = 34.2 m Mol

ad 200 ml aqua bidestillata

Herstellung des gebrauchsfertigen Puffers:

109 ml Krebs-Ringer Lösung und 19 ml NaHCO₃ Lösung, die vorher 5 Min. lang mit reinem CO₂ begast wurde, werden gemischt und 10 Min. lang mit Carbogen begast. Der so hergestellte Puffer hatte bereits einen pH von 7.3, der nur selten durch Schütteln (CO₂ Austreibung) oder durch nochmaliges kurzes Begasen mit CO₂ korrigiert werden mußte. Diesem Puffer wurde soviel Glucose zugesetzt, daß die Endkonzentration 300 mg % betrug.

Herstellung des Insulinstandards

Es wurde soviel 10 x umkristallisiertes, glucagonfreies Rinderinsulin der Fa. Hoechst in 10 ml HCl von einem pH = 2,6 gelöst, daß 1 ml dieser Lösung 20 IE Insulin enthielt. Diese Lösung wurde bei 0 - 2° C aufbewahrt und etwa alle 4 Wochen erneuert. Die Lösungen a und b wurden für jeden Versuchstag neu angesetzt.

Lösung a : 0.1 ml Standardlösung werden in Glucose-Pufferlösung ad 10.0 ml gelöst.

1 ml dieser Lösung a enthält
0.2 IE Insulin

Lösung b : 0.1 ml Lösung a werden mit Glucose-Pufferlösung ad 10.0 ml verdünnt.

1 ml Lösung b enthält 0.002 IE = 2000 μ E

Diese Lösung b wurde für die Eichwerte verwendet.

Als Reaktionsgefäße wurden geeichte Warburg-tröge mit Kamin verwendet, die ein durchschnittliches Volumen von 14 ml hatten. Als Manometer wurden U-förmige Kapillarmanometer der Fa. Gilson-Elektronica benutzt.

Bestimmung der Serumglucose

Wir haben zur Bestimmung des wahren Glucosegehalts der Seren die enzymatische Methode der Fa. C.F.Boehringer & Söhne, Mannheim benutzt. Die Normalwerte betragen 46 bis 94 mg %. Die Fehlerbreite liegt unter ± 5 %.

Prinzip

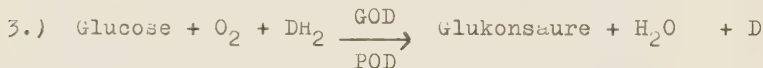
Das Enzym Glucoseoxydase (GOD) katalysiert die Oxydation von β -D-Glucose zum Glukonlakton, das weiter mit Wasser zu Glukonsäure reagiert:



Das dabei entstehende H_2O_2 wird in gekoppelter Indikatorreaktion weiter umgesetzt. H_2O_2 oxydiert unter enzymatischer Katalyse durch Peroxydase (POD) den Wasserstoffdonator " DH_2 " (z.B. o-Dianisidin) der dabei in den rotbraunen Farbstoff "D" übergeht:



Die Gesamtgleichung lautet dann



Die Menge des braunen Farbstoffes D ist also ein Maß für die umgesetzte Glucosemenge. Da die Reaktionen quantitativ ablaufen und GOD spezifisch auf D-Glucose eingestellt ist, wird also nur die "wahre Glucose" gemessen. Der Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 436 m μ kolorimetrisch bestimmt.

Notwendige Reagenzien:

1. Natriumdihydrogenphosphat NaH_2PO_4
2. Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4
3. Glucose - Oxydase GOD

4. Peroxydase POD
5. o - Dianisidinhydrochlorid
6. D - Glucose, DAB 6

Diese Reagenzien sind enthalten in der Biochemica
TEST COMBINATION.

Herstellung der Lösungen:

1. Puffer - Enzym - Gemisch
0.12 Mol Phosphatpuffer, $\mu\text{H} = 7.0$
40 μg Peroxydase/ml
250 μg Glucoseoxydase/ml
ad 150 ml aqua bidestillata
2. Chromogen
6.6 mg o - Dianisidinhydrochlorid/ml
ad 2.0 ml aqua bidestillata
3. Glucosestandardlösung
91 μg Glucose/ml
4. 3.6%ige Perchlorsäure zum Enteiweißen

Die Substanzen 1 und 2 werden im Verhältnis
100 : 1 gemischt und ergeben das Glucosereagenz.

Durchführung:

- a. Die dem zu untersuchenden Inkubationsmedium
entnommene Probe von 0.1 ml wird mit
3,6%iger Perchlorsäure enteiweißt und 5 Min.
bei 3000 U/Min. zentrifugiert.
- b. Bestimmungsansatz

Reagenzienleerwert	5.0 ml Glucosereagenz
	0.2 ml aqua bidest
Glucosestandardwert	5.0 ml Glucosereagenz
	0.2 ml Glucosestandardlösung

zu untersuchende	5.0 ml Glucosereagenz
Proben	0.2 ml enteiweißter Lösungsüberstand

Die Ansätze bleiben 35 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Nach dieser Zeit wird die Extinktion aller Proben, sowie die des Glucosestandardwertes, gegen die Extinktion des Reagenzienleerwertes bei einer Wellenlänge von 436 m in 1 cm Küvetten abgelesen.

Berechnung:

Um den Glucosegehalt pro ml Blut zu erhalten, bezieht man die Messung auf die Extinktion der Glucosestandardlösung. Der Glucosestandardwert enthält 18.2 μ g Glucose pro Reaktionsansatz, was 1 mg/ml Blut entspricht, es ist also

$$\frac{\Delta \text{ E Probe}}{\Delta \text{ Standard}} = \text{mg/ml Blut} \quad \text{oder}$$

$$\frac{\Delta \text{ E Probe}}{\Delta \text{ Standard}} \times 100 = \text{mg\% Glucose}$$

Spezifität

Dieser Test ist spezifisch auf D-Glucose. Andere Zucker (z.B. Fructose, Lactose, Galaktose, Pentosen) werden nicht erfasst. Lediglich Mannose ergibt eine positive, aber erheblich schwächere Reaktion als Glucose; jedoch sind keine pathologischen Bedingungen bekannt, bei denen Mannose im Blut vorkommt. Reduzierende Substanzen wie Kreatinin, Glucuronsäure und Harnsäure stören

nicht. Dagegen können hohe Glutathion-Konzentrationen und extrem hohe Dosen von Vitamin C zu niedrige Werte vortäuschen.

III. Ergebnisse

Tabelle 1

No.	Name	Alter	Übergewicht in % nach Broca	Serumglucose in mg% (Vorversuch)		Serumglucose in mg% (Hauptversuch)	
				0'	60'	0'	120'
1	H.E.m	41	-15	60	65	69	68
2	W.M.w	71	-14	62	91	-	81
3	R.R.m	60	-13	79	68	72	73
4	S.H.w	48	-9,5	69	76	72	74
5	M.H.m	17	-7,5	83	74	-	-
6	H.E.w	46	-7	56	62	55	57
7	W.K.m	27	-6,5	61	63	52	63
8	L.J.w	36	-6	-	88	86	56
9	M.O.w	61	-2	77	78	51	61
10	D.J.m	55	0	-	-	72	48
11	T.J.m	79	3	-	65	-	-
12	F.C.m	58	4	84	72	79	71
13	P.K.m	46	6	56	51	-	-
14	D.K.m	44	6	63	74	64	80
15	S.T.w	43	9	83	81	78	86
16	P.H.w	63	12	70	96	72	72
17	S.M.m	54	13	67	73	39	35
18	S.J.m	30	15	54	77	68	-
19	B.T.w	54	18	56	86	50	56
20	S.A.m	63	28	84	-	59	53
21	R.J.w	61	38	65	72	55	49
22	H.C.w	50	45	74	66	72	55
23	O.H.w	58	69	73	69	77	91

Tabelle 2

No.	Gesamt IIA in $\mu\text{E/ml}$ Vorversuch			Gesamt IIA in $\mu\text{E/ml}$ Hauptversuch		
	0'	60'	120'	0'	60'	120'
1	190	205	200	250	270	240
2	440	430	600	530	830	490
3	110	225	205	530	530	295
4	135	180	335	195	370	190
5	440	475	440	300	205	275
6	860	470	315	400	600	430
7	180	465	1400	720	695	1050
8	600	160	155	400	510	410
9	150	320	960	145	63	92
10	285	1800	230	520	100	96
11	780	1180	1020	550	620	880
12	420	1200	880	2100	2050	1900
13	200	400	725	850	720	1600
14	900	3500	1700	1400	1750	540
15	330	295	270	225	410	315
16	3400	4300	1480	3900	3700	2100
17	540	540	485	670	430	475
18	1130	320	310	300	225	310
19	480	660	700	600	500	550
20	360	560	2000	3900	1950	1150
21	1420	2050	2330	430	680	1750
22	99	150	380	140	290	120
23	2100	1150	860	830	950	1060

Tabelle 3

No.	"Freies" Insulin in $\mu\text{E/ml}$ Vorversuch			"Freies" Insulin in $\mu\text{E/ml}$ Hauptversuch		
	0'	60'	120'	0'	60'	120'
1	0	0	0	0	10	70
2	285	235	490	385	610	320
3	12	65	0	185	260	130
4	22	70	185	25	140	90
5	285	210	180	135	0	100
6	585	245	45	0	365	195
7	0	220	1035	190	440	865
8	320	35	45	100	305	110
9	0	160	725	117	15	18
10	140	1200	105	398	0	0
11	330	1025	200	0	0	235
12	0	640	80	1200	1070	800
13	0	0	0	0	370	900
14	310	3070	720	970	1550	0
15	0	95	115	0	0	110
16	2670	3400	520	3030	2000	1320
17	95	240	135	330	255	70
18	915	239	225	135	144	210
19	0	180	525	465	270	0
20	0	0	1710	3100	1755	890
21	890	1430	1910	70	240	1380
22	49	115	346	71	248	51
23	1540	680	660	640	825	740

Tabelle 4

Gesamtdurchschnittswerte

Gesamt-ILA in μ U/ml

a) Normalgewichtige	0'	60'	120'
Vorversuch	401	754	629
Hauptversuch	608	648	574
b) Fettsüchtige	0'	60'	120'
Vorversuch	1191	1214	1068
Hauptversuch	1346	1091	939

"Freies" Insulin in μ E/ml

a) Normalgewichtige	0'	60'	120'
Vorversuch	153	485	262
Hauptversuch	247	342	263
b) Fettsüchtige	0'	60'	120'
Vorversuch	770	783	754
Hauptversuch	986	717	583

Tabelle 5

Durchschnittswerte der Seren,
bei denen der Glucosegehalt bestimmt wurde.

Blutglucose in mg%

a) Normalgewichtige	0'	60'	120'
Vorversuch	69	72	79
Hauptversuch	68	71	68
b) Fettsüchtige	0'	60'	120'
Vorversuch	68	77	68
Hauptversuch	62	69	59

"Freies" Insulin in μ E/ml

a) Normalgewichtige	0'	60'	120'
Vorversuch	125	434	262
Hauptversuch	290	314	226
b) Fettsüchtige	0'	60'	120'
Vorversuch	770	895	754
Hauptversuch	986	534	636

Gesamt-ILA in μ E/ml

a) Normalgewichtige	0'	60'	120'
Vorversuch	363	679	629
Hauptversuch	626	547	504
b) Fettsüchtige	0'	60'	120'
Vorversuch	1191	1310	1068
Hauptversuch	1346	718	1029

IV. Diskussion

Aus technischen Gründen konnte nicht für alle Seren der Glucosegehalt bestimmt werden. Daher wurden zwei verschiedene Reihen von Insulindurchschnittswerten berechnet, die sich jedoch im Prinzip in etwa entsprechen.

Reihe 1: Mittelwerte (0', 60', 120') aller Insulinwerte (Tabelle 4)

Reihe 2: Mittelwerte (0', 60', 120') nur derjenigen Insulinwerte, zu denen die zugehörigen Glucosebestimmungen vorlagen (Tabelle 5)

Es zeichnen sich folgende Ergebnisse ab:

a) ILA

Bei Normalgewichtigen zeigen beide Mittelwertreihen im Vorversuch einen mäßigen Anstieg der Insulinwerte mit einer kleinen Spitze bei 60'.

Bei Normalgewichtigen im Hauptversuch liegen die Mittelwerte der Reihe 1 etwa gleich hoch und fallen bei der Reihe 2 sogar kontinuierlich etwas ab.

Bei Fettsüchtigen liegen die Gesamtinsulinwerte generell deutlich höher als bei den Normalgewichtigen.

Bei Fettsüchtigen liegen im Vorversuch die Werte beider Reihen annähernd gleich hoch mit einer kleinen Spitze bei 60'.

Bei Fettsüchtigen zeigt sich im Hauptversuch in beiden Reihen ein deutlicher Abfall der ILA. In Reihe 1 ist der Abfall kontinuierlich, in Reihe 2 ist er nach 60' starker als nach 120'.

o) "Freies" Insulin

Bei Normalgewichtigen verlaufen die Werte des Vorversuches in beiden Reihen ganz entsprechend der ILA.

Bei Normalgewichtigen zeigen beide Reihen im Hauptversuch eine kleine Spitze bei 60'. Bei Reihe 2 wird ein leichter Abfall nach 120' sichtbar.

Bei Fettsüchtigen entsprechen die Werte der Reihen 1 und 2 im Vor- und Hauptversuch vollkommen dem Verlauf der Werte des Gesamtinsulins.

Bei Fettsüchtigen liegen auch die Werte des "freien" Insulins generell höher als die bei Normalgewichtigen.

c) Blutglucose

Die Glucosewerte im Hauptversuch liegen stets etwas unter denen im Vorversuch. Im übrigen ist der Kurvenverlauf unauffällig.

Aus den vorliegenden Ergebnissen, die wegen der starken, methodisch bedingten Streuung keine statistische Absicherung erlauben, lassen sich folgende Gesetzmäßigkeiten erkennen: Wie schon von verschiedenen anderen Autoren beschrieben, finden sich bei Fettsüchtigen deutlich höhere Werte des "freien" Insulins und der ILA im Serum (7, 23). Mit unserer Methodik läßt sich darüber hinaus erkennen, daß die von Grodsky und Mitarbeitern (7) nach Biguanidverabreichung gemachte Beobachtung zutrifft. Diese Autoren hatten bei mehrtägiger Verabreichung von Phenyläthylbigu-

anid eine Verminderung der Insulinsekretion nach Gaben von Glucose (per os oder intravenös) gesehen. Dieses Phänomen läßt sich auch bei einmaliger Verabreichung von Butylbiguanid ohne zusätzliche Glucosegabe erkennen. Bei Normalgewichtigen, vor allem aber bei Fettsüchtigen, bewirkt die Biguanidverabreichung eine deutliche Minderung der Seruminsulinwerte im Vergleich zu den ohne Biguanid durchgeführten Kontrollen an den gleichen Personen. Im Gegensatz zu den Vermutungen von Sterne läßt das bei unseren Untersuchungen parallel laufende Verhalten der Werte der Gesamt-ILA und des "freien" Insulins nicht darauf schließen, daß unter Biguanideinwirkung gebundenes Insulin in "freies" Insulin umgewandelt wird. Auch wenn aus den erwähnten Gründen auf eine statistische Absicherung verzichtet werden mußte, ist es doch möglich, diese Aussagen bei dem für jede Patientengruppe erkennbaren Trend zu machen.

Man kann den Befund wohl am besten in der Weise deuten, daß man eine Einsparung an körpereigenem Insulin infolge des die Glucoseutilisation verstärkenden Effekts der Biguanide annimmt. Auch bei Diabetikern und im Tierexperiment konnte gezeigt werden, daß die Biguanide in ihrer Wirkung auf geringe Mengen von Insulin angewiesen sind (1). Es spielt dabei keine Rolle, ob es sich um endogenes oder exogenes Insulin handelt, während z.B. die Sulfonylharnstoffpräparate nur bei Vorhandensein von endogenem Insulin wirksam sind (1). Unsere Ergebnisse fügen sich gut in dieses Bild. Greutzfeldt hatte gezeigt, daß bei eviscerierten, nephrektomierten Ratten, die unter konstanter

Glucoseinfusion am Leben erhalten wurden, eine Blutzuckersenkung mit Biguanid oder einer unerschwelligen Insulindosis allein nicht zu erreichen war. Wenn dagegen die gleiche Menge Biguanid und die gleiche Menge Insulin zusammen appliziert wurden, fielen die Blutzuckerwerte stark ab (24). Wenn nun - wie bei unseren nichtdiabetischen Probanden - an sich genug körpereigenes Insulin vorhanden ist, dann könnte umgekehrt die Zuführung einer die Glucoseutilisation auf andere Weise verstärkenden Substanz eine Verminderung der Insulinsekretion mit sich bringen. Dies ist sogar wünschenswert, da ja sonst mit dem Auftreten einer Hypoglykämie zu rechnen wäre. Wenn auch ein gewisses Absinken der Blutglucose bei den mit Butylbiguanid behandelten Probanden zu verzeichnen war, so kann doch von einem ausgeprägten blutzuckersenkenden Effekt der Biguanide bei diesen nichtdiabetischen Personen nicht die Rede sein. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit früheren Mitteilungen anderer Autoren, die ebenfalls auf das Ausbleiben hypoglykämischer Erscheinungen hinwiesen (25,26). Es ist ein großer Vorzug der Biguanide, daß offensichtlich nur hyperglykämische Werte auf das Niveau der Normoglykämie gesenkt werden, während der Schritt von der Normoglykämie zur Hypoglykämie niemals vollzogen wird. Wenn man darauf bedacht ist, die Seruminsulinwerte besonders bei Fettsüchtigen zu senken, wäre nach unseren Ergebnissen eine Biguanidverabreichung durchaus zu diskutieren. Man sollte dabei allerdings stets bedenken, daß die kausalthherapie der Fettsucht in Verminderung der Kalorienzufuhr zu liegen hat und daß

die Senkung der Werte des für die Lipogenese verantwortlichen Hormons Insulin nur eine zusätzliche Hilfe sein dürfte, der verstärkten Fettsynthese entgegenzuwirken.

V. Zusammenfassung:

Bei 23 Nichtdiabetikern, 8 Fettsüchtigen und 15 Normalgewichtigen, wurden die Nachternseruminsulinspiegel und die Serumglucose vor und nach Gabe von Butylbiguanid gemessen. Bei den Insulinspiegeln wurde sowohl die Gesamt-ILA als auch das "freie" Insulin bestimmt und zwar nach der von Froesch und Mitarbeitern angegebenen Fettgewebsmethode (Nettogasaustausch) (20). Die Werte nach Gabe von 100mg Butylbiguanid per os wurden in Serumproben bestimmt, die 60' und 120' nach der Zuführung des blutzuckersenkend wirkenden Antidiabeticums gewonnen wurden. Dabei ließen sich folgende Ergebnisse erkennen, die allerdings wegen der methodisch bedingten starken Streuung nicht statistisch abgesichert werden konnten:

Die Blutglucosewerte lagen nach Biguanidgabe etwa im gleichen Bereich wie im Vorversuch ohne Biguanidgabe. Generell lagen die Insulinwerte der Fettsüchtigen über denen der Normalgewichtigen. Das bezieht sich sowohl auf die Gesamt-ILA wie auch auf das "freie" Insulin. Nach Biguanidgabe fand sich - wesentlich stärker ausgeprägt bei den Fettsüchtigen - ein Absinken sowohl der Gesamt-ILA als auch des "freien" Insulins.

Damit konnte, wie Grodsky und Mitarbeiter (7) und Salans und Reaven (27) für die Insulinwerte nach Glucosebelastung und Biguanidgabe gefunden haben, gezeigt werden, daß die von Sterne zur Diskussion gestellte Hypothese, die blutzuckersenkende Wirkung der Biguanide sei auf eine Überführung von gebundenem in "freies" Insulin zurückzuführen (28), auch im Kurzversuch und bei nüchternen Patienten der Grundlage entbehrt.

Herrn Professor Dr. W. S e i t z (Direktor der
Medizinischen Universitäts - Poliklinik) und
Herrn Professor Dr. W. L a m b o r e c h t
(Direktor des Biochemischen Institutes der Techni-
schen Hochschule in München - Pasing) danke ich für
die Möglichkeit, die experimentellen Untersuchungen
durchgeführt haben zu können.

Herrn Priv. Dozent Dr. H. M e h n e r t (Medi-
zinische Universitäts - Poliklinik) danke ich für
die Überlassung des Themas und die großzügige Un-
terstützung.

VI. Literaturverzeichnis

1. H. Mehnert Zur Behandlung der Zucker-
krankheit mit oralen Antidi-
abetica
Dtsch. Arztebl., Arztl. Mit-
teilungen 1964, 2553 - 2557
2. K. Stuhlfauth,
H. Mehnert,
G. Schafer,
G. Kallampetsos Untersuchungen zum Wirkungs-
mechanismus der Sulfonyl-
harnstoffe
Klin. Wschr. 38, 1960, 825
3. W.J.H. Butterfield,
R.J. Whiclow The Hypoglycemic Action of
Phenformin. Effect of Phen-
formin on Glucose Metabolism
in Peripheral Tissues
Diabetes 11, 1962, 261
4. G.L. Schless Nonesterified Fatty Acids as
a Metabolic Substrate: The
Rapid Turnover Theory
Metabolism 13, 1964, 934
5. H. Mehnert,
G. Schafer vergleichende Untersuchungen
zur Wirkung von Biguaniden
auf die Glucoseoxydation am
epididymalen Fetthanhang der
Ratte und am subcutanen Fett-
gewebe des Menschen.
Klin. Wschr., 40, 1962, 554
6. H. Daweke,
I. Bach Experimental Studies on the
Mode of Action of Biguanides
Metabolism, 12, 1963, 391

7. G.M. Grodsky,
J.H. Karam,
F.Ch. Pavlatos,
F.H. Forsham
Reduction by Phenformin of
Excessive Insulin Levels
after Glucose Loading in
Obese and Diabetic Subjects
Metabolism, April 1965, 278
8. H. Mehnert
Experimentelle und klinische
Untersuchungen zu Wirkungs-
mechanismus und Indikations-
bereich blutzuckersenkender
Biguanidderivate
Habilitationsschrift 1965
München
9. F. Meyer
Etude sur le mode d'action
des biguanides hypoglycémiants
C.R. Acad. Sci. (Paris)
1920, 1900, 251
10. R. Beckmann,
G. Hübner
Zur Pharmakokinetik von 1-
butyl-biguanid-hydrochlorid
und einer Retard-Form dieser
Substanz
Arzneimittel Forsch., 15
1965, 705
11. R.E. Iranquaga
In vitro metabolic studies
with DBI on rat diaphragm
and adipose tissue
Clin. Res. Proc. 10, 1962, 90
12. M.J. Schwartz,
St. Mirsky
L.E. Schaefer
Phenformin, Serum-lipids and
diabetes mellitus
Lancet, 1965/I, 959

13. H. Köhler,
H.G. Lippmann
Fettleber - Entstehung bei
Carassius auratus in glucose-
reichem milieu und deren Be-
einflussung durch N_1 -n-Butyl-
biguanid sowie N'-(4-methyl-
benzoylsulfonyl)-N'-butylharn-
stoff (Tolbutamid)
Acta biol. med. germ., 11,
1963, 866
14. H.M. Wilks
A.R. Colwell
Metabolic Balance Studies of
Oral Compounds in Severe
Diabetes
Diabetes 11, Suppl. 50, 1962
15. J.R. Williamson
R.S. Walker
A.S. Renold
Metabolic Effects of Phenethyl-
biguanid (DBI) on the Isolated
Perfused Rat Heart
Metabolism 12, 1963, 1141
16. H.G. Lippmann
Verteilungsraume für Glucose,
Glucoseanaloge, α -Aminostick-
stoff und freie Fettsäuren
unter der Wirkung von N_1 -n-
Butylbiguanid am eviscerierten,
nephrektomierten Tier
Acta biol. med. germ.
12, 1964, 104
17. H.J. Whichelow
W.J.H. Butterfield
M.E. Abrams
Vortrag auf dem 5. Kongreß
der internationalen Diabetes-
vereinigung, Toronto 1964
18. W.J.H. Butterfield
zit. nach Sterne: The Present
State of Knowledge on the Mode
of Action of the Antidiabetic
Diguanides. (Persönliche Mit-
teilung)
Metabolism 13, 1964, 791

19. W. Hildmann,
H.G. Lippmann
Aktivitäten von Glucose-
6-phosphatase und Hexoki-
nase unter Einwirkung von
 N_1 -n-Butylbiguanid
Acta biol. med. germ.
11, 1963, 345
20. E.R. Froesch
H. Bürgi
P. Bally
E.B. Ramseier
A. Labhart
Antibody suppressible and
nonsuppressible insulin-
like-activities in human
serum and their physiologic
significance. An insulin
assay with adipose tissue
of increased precision and
specificity.
J. of Clin. Invest., 1963
1816
21. F.X. Hausberger
S.W. Milstein
R.J. Rutman
The influence of insulin on
glucose utilization in adipose
and hepatic tissues in vitro
J. biol. Chem., 208, 1954, 431
22. S.W. Milstein
F.X. Hausberger
Lipogenesis and carbohydrate
utilization, effects of the
glucose concentration and
insulin in rat liver and
adipose tissue
Diabetes, 5, 1956, 89
23. H. Daweke
H. van Landegheim
I. Bach
H. Zimmermann
A. Breitbach
Bestimmung der insulinähnli-
chen Aktivität und der physi-
ologischen Insulinreserve bei
schwerer Adipositas
Klin. Wschr., 43, 1965, 185

24. W. Greutzfeldt
U. Deuticke
H.D. Söling
Potenzierung der Wirkung von
exogenem Insulin durch N(-4-
-Methylbenzolsulfonyl)-N-
butylcarbamid und N₁-n-Bu-
tylbiguanid beim eviscerier-
ten Tier
Klin. Wschr., 39, 1961, 790
25. S.S. Rajans
J.A. Moorhouse
H. Doorenbos
L.H. Louis
J.W. Conn
Metabolic effects of Phene-
thylbiguanide in normal
subjects and in diabetic
patients
Diabetes, 9, 1960, 194
26. L.L. Madison
A.H. Ungar
Effect of phenformin on peri-
pheral glucose utilization in
human diabetic and nondiabetic
subjects
Diabetes, 9, 1960, 202
27. L.D. Salans
G.M. Reaven
Effect of oral hypoglycemic
agents on serum insulin-like
-activity of patients with
various degrees of carbohy-
drate intolerance
Metabolism, 14, 1965, 26
28. J. Sterne
Mécanisme d'action des
biguanides antidiabétiques
Presse méd. 72, 1964, 17

Lebenslauf

Am 11.11.1941 wurde ich, Irmhild Gerda Angstenberger, als erste von zwei Töchtern des prakt. Arztes Dr. med. Rudolf Angstenberger und seiner Frau Ursula, geb. Smolla, in Breslau geboren. Nach unserer Vertreibung aus Schlesien kamen wir nach Berggau, Krs. Neumarkt (Oberpfalz), wo ich von 1947 an vier Jahre lang die Volksschule besuchte. 1951 trat ich in die Oberrealschule in Neumarkt ein, die ich 1958 wegen der Umsiedlung meiner Eltern nach Burgweinting, Krs. Regensburg wieder verließ. Meine Schulausbildung setzte ich an der Oberrealschule an der Goethestraße in Regensburg fort, an der ich im Juli 1960 die Reifeprüfung bestand.

Mit dem WS 1960/61 begann ich mein Medizinstudium an der Universität Erlangen. Nach zwei Semestern bestand ich das Vorphysikum und nach weiteren drei Semestern das Physikum. Danach setzte ich mein Studium an der Universität Freiburg fort. Seit dem 3. klinischen Semester studiere ich an der Universität München. Ich beabsichtige, im Sommer 1965 mein Medizinstudium mit dem Staatsexamen abzuschließen.

